第14卷 第1期　　昆虫学报　　Vol. 14, No. 1
1965年1月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Jan., 1965

粘虫头部螢光物質紙层析与电泳研究*

PAPIER-CHROMATOGRAPHISCHE UND ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FLUORESZIERENDE STOFFE IN DEN KÖPFEN VON *LEUCANIA SEPARATA* WALKER (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

王敏慧　　周德明　　馮喜昌
WANG MIN-HUI　　ZHOU DE-MING　　FENG XI-CHANG
(中国科学院动物研究所)
(*Zoologisches Institut, Academia Sinica*)

一、引　　言

昆虫头部,特别是复眼存在着特定的螢光物質,这是近十年来一系列研究所查明的一个基本事实。对于这些螢光物質的性質和作用則正从生物化学、遺传学和生理学等几个方面进行着研究。然而直到目前为止,这方面工作的开展还很有限,并且大部分工作是以果蝇 *Drosophila melanogaster* 和粉螟 *Ephestia kühniella* 作出的。Grossbach (1957) 曾对三十种鱗翅类昆虫的复眼及头部作了紙层析研究。其中用五种夜蛾科昆虫所作試驗的結果是,他在紙层析譜上总共得到了六块較規則和較明亮的螢光斑点。我們这里所用的材料是我国为害严重的夜蛾科害虫,粘虫 (*Leucania separata* Walker)。紙层析和电泳都显示出較多的斑点。其中有些是与其他昆虫相同的,少数可能是尚未被記录过的。

二、材料与方法

本項工作所取的材料主要是粘虫成虫的头部和复眼。成虫为实驗室飼养的和南北各地自然界采集的 (草把和糖醋液誘集的以及大田挖蛹羽化所得)[1]。这些材料都是在勻浆器中用75%甲醇提取試样的,层析所用濾紙为新华一号, Whatman 一号与北京濾紙。每张 28×28 厘米或 30×30 厘米的双向层析紙上,施用五个头 (或五对复眼) 的提取物。此种提取物經过真空減压浓縮后直接施于紙上。层析譜的展开都是上行的并且在黑暗中进行。部分試驗的全部工作过程在紅光和黑暗中进行。层析温度是 15—20℃ 和 20℃ 恆温。我們曾試用过十几种溶剂系統,这里給出主要的結果有以下五組: A. 正丙醇:1%氨水 (2:1)/4% 柠檬酸鈉 (Merck) 水溶液; B. 正丙醇:1%氨水 (2:1)/正丁醇:乙酸:水 (4:1:5 与 20:3:7); C. 正丙醇:1%氨水 (2:1)/水飽和的三甲基吡啶; D. 正丙醇:1%氨水 (2:1)/3%氯化銨水溶液; E. 85% 甲酸:甲醇:盐酸 (80:15:0.5)/4%柠檬酸鈉水溶

* 此项工作系粘虫种群分析的一部分研究工作。本项研究一直得到马世駿教授的关心与支持,于此謹志谢意。
1) 本所昆虫生态室梁兴善等同志,东北、旅大、合江、內蒙、贵州、毕节、云南、丽江、福建等农科所,中南昆虫所、广西玉林农試站、峨眉、信宜、瀾滄等县农业局以及其他一些单位曾提供大量粘虫标本,于此一并志谢。

液。其中分离效果最好的是系統 A。用这組溶剂系統对南北方三十几个地点的粘虫地方种羣样本，作出了两百张紙层析譜。紙电泳所用材料来源同前，这里給出的結果是以旅大和徐州的标本作出的。試驗主要取复眼部分，以 75% 甲醇于匀浆器中研磨提取。提取物經浓縮后直接施于紙上。所用濾紙为新华一号。电泳是在单向平卧液冷式高压电泳装置上进行的。以循环自来水通过沸程为 60—90℃ 的石油醚来吸收电泳时所产生的热。槽內温度随水温而波动于 14—18℃ 之間。我們曾試用过以下五种緩冲液：（1）pH 1.9，甲酸：冰乙酸：水(15:10:75)，电导率 5*mS*。（2）pH 4.5，Na_2HPO_4-柠檬酸緩冲液，电导率 7 *mS*。（3）pH 8.4，K_2HPO_4 緩冲液，电导率 10*mS*；池液为 40*mS* 电导率的 K_2HPO_4。（4）pH 9.2，$Na_2B_4O_7$ 緩冲液。（5）pH 11.5，Na_2CO_3 緩冲液。在上述这些緩冲液中，（4）与（5）由于 pH 値較高，电滲比較严重，以致影响分离效果，使某些斑点位置不稳定，因而大部分工作是以前三种緩冲液作出的。层析及电泳所得紙譜在干燥后于暗室中用 365mμ 的紫外光灯检查螢光斑点，螢光的相对亮度主要分五級，I 級极亮，V 級为明显可以看出的斑点。另外尙有一些隐約可見的斑，但这里沒有仔細描述这一类斑点。

三、結果与討論

本項研究所用濾紙主要为国产新华一号，其层析效果大致与 Whatman 一号相似。北京濾紙也可用，但因其紙質松軟，部分亮度較小的斑点往往因扩散而不易检出。下面給出的結果主要都是用新华一号紙作出的。

溶剂系統 A 所展开的紙层析譜总共检出三十几块斑点。图 1 記录了在全部試驗中出現頻率較大的斑点，其中 A_1—A_{11} 这十一块斑点則是較規則較明亮的基本斑点，几乎每个样本都能检出，并且其相对量大致是稳定的。A_1 在两向都具有很低的 R_f 値，螢光为橙黄色，日光下显示为鮮黄色，亮度为 III/V 級，一般为 IV 級。A_2 螢光顏色浅淡，一般为 V 級。

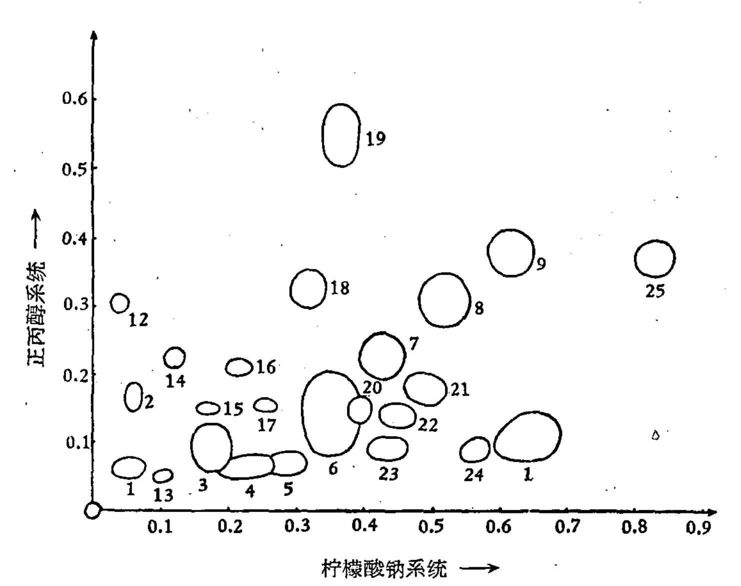


图 1　粘虫头部提取物在系统 A 所展开的层析谱上显示出的螢光斑点分布图样

A_3 綠蓝色，III/V 級，一般 IV 級。A_4 在日光下及所发螢光皆呈橘紅色，亮度为 III/IV 級。A_5 暗紫蓝色，V/IV 級。A_6 深蓝紫色，III/II 級。A_7 綠蓝色，IV 級。A_8 天蓝色，IV 級。A_9 灰蓝至天蓝色，V 級。A_{10} 亮綠蓝色，日光下略呈黄綠色，I/II 級。A_{11} 蓝紫色，III/V級，一般为 IV 級，R_f 值在第一向很高，第二向为零，为节省篇幅起見图中未录出。这些斑点部分地相当地中海粉螟头部螢光物质层析譜上的某些斑点，A_3 相当于 Or、A_6 是 g、A_8 是 K_1、A_9 是 K_2、A_{10} 是 C_1(Kühn u. Egelhaaf, 1959)。斑点 A_{12}—A_{25} 一般为 V 級，个别 IV 級或仅隐約可見，其中除少数可能是降解产物外，大部分都是头部固有物质，并且也見于单純复眼所作的层析譜。这里应該指出的是，在某些样本中这些斑点的出現情况是有一定差异的。A_{13}、A_{18} 与 A_{20} 为灰黄至黄色螢光斑点，A_{13} 黄白色、V 級，但在紅光及黑暗中的层析譜上未能检得，它或許是一种光解产物。A_{18} 灰黄色、V 級，在南方样本中出現的頻率較大，相对量也較多，其在紙譜上的位置接近核黄素（我們曾用合成的核黄素作对照）。A_{20} 灰黄至黄色，日光下略呈黄綠色，最亮可至 IV 級，但也經常不能检到。其他斑点都略呈蓝色。A_{21} 发綠蓝色至灰蓝色螢光，其在层析譜上的位置很接近黄蝶呤（我們用合成的黄蝶呤作对照）。但此斑点仅于部分样本中检得，一般在 IV 級以下，多半 V 級。A_{19} 螢光顏色和位置都接近狗尿酸。A_{23} 可能是作为光解产物的蝶呤羧酸-(8)。除图 1 所录二十五块斑外，尙有十块左右的斑点于此未作記录，因其不很稳定或仅出現于少数乃至个别地方样本。此外，这一系統的大量試驗表明，复眼和全头之間的层析譜以及雌雄头部之間的层析譜不存在明显差异。

系統 B (1) (第二向正丁醇系統的比例是 4:1:5) 所展开的层析譜上可检得二十几块斑点。图 2 記录了出現頻率較大和較規則的十三块斑点。其中 B_1—B_9 是最基本的斑点，B_1 为发黄至橘紅色的斑点，亮度 IV 級，在第二向 R_f 值很低且常与 B_2 相愈合，它可能相当于 A_1。B_2 发橘紅色螢光、IV 級，相当于 A_4。B_3 綠蓝色、I/II 級，相当于 A_{10}、B_4 蓝紫色，II/III 級，相当于 A_6。B_6 綠蓝色、IV 級，相当于 A_7。B_8 与 B_7 常愈合，有时只显示为一块斑，天蓝色，IV/V 級，相当于 A_9 与 A_8。B_9 在图中未标出，是为在两向中 R_f 值都很高的蓝紫色斑点，相当于 A_{11}。如与 Grossbach (1957) 在同样溶剂系統中的鱗翅类复眼层析結果相对照，則 B_2 相当于 b, B_3 是 C_1, B_4 是 Isx(异黄蝶呤), B_7 与 B_8 是 K。B_{13} 浅蓝紫色，一般 V 級，个别 III/IV 級。其余斑点皆略呈蓝色。本系統所作层析結果中某些未录出斑点仅出現于部分地方种羣样本所作层析譜，但因所作試驗重复次数不够多，于此暂不論及。

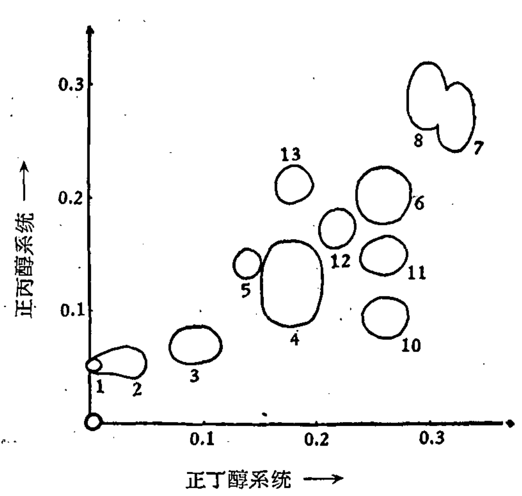


图 2　粘虫头部提取物在系统 B(1) 中所展开的层析谱上显示出的螢光斑点分布图样

系統 C 所展开的层析譜上共检得二十块左右的螢光斑点。图 3 記录了其中的十五块。C_1 略呈綠蓝色、IV/V 級，可能相当于 A_3。C_2 綠蓝色、I/II 級，相当于 A_{10}。C_4 浅蓝紫

色、V 級，可能相当于 A_5。C_5 橘紅色、IV 級，相当于 A_4。C_6 灰黄至黄色，可能相当于 A_1。C_7 略呈蓝色、V/IV 級。C_8 蓝紫色、III 級，相当于 A_6。C_{10} 綠蓝色、IV 級，相当于 A_7。C_{11} 天蓝色、IV/V 級，相当于 A_8。C_{12} 灰蓝色、V 級，相当于 A_9。C_{13} 灰黄色、II 級，可能相当于 A_{20}。C_{14}、C_{15} 皆为浅蓝色、V 級。

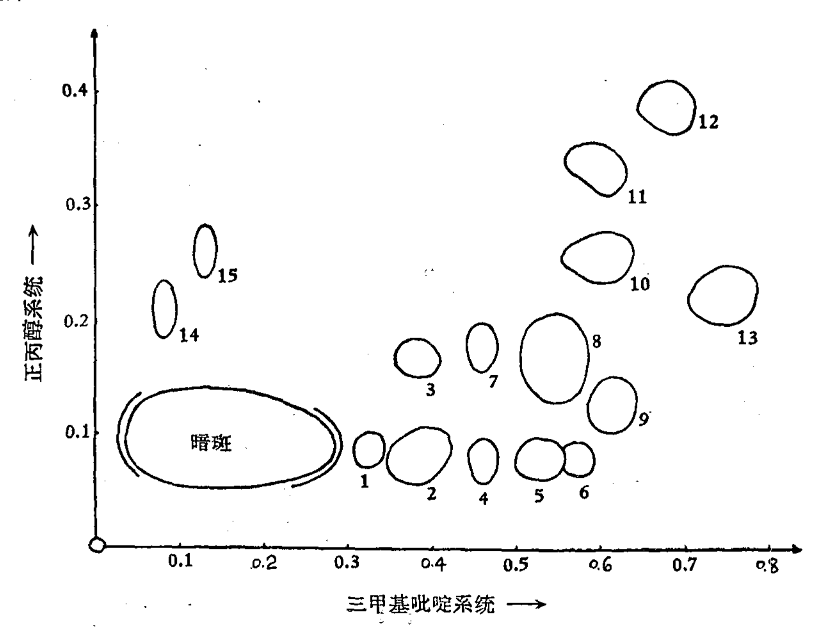


图 3 粘虫头部提取物在系統 C 所展开的层析譜上显示出的螢光斑点分布图样

系統 D 所展开的层析譜显示出与系統 A 有很相近似的基本情况，十几块主要斑点的相对位置大体是接近的。当然也有一些差异，斑点在第二向的 R_f 值是有变化的，其中最明显的是相当于 A_{18}、A_7 和 A_6 的三块斑在 NH_4Cl 系統中有相接近的 R_f 值，因而縱方向几乎是在一直綫上的。此外，部分斑点在本系統中不易或不能检到，而某些斑点則似乎更易检出。

系統 E 所展开的层析譜只显示出五块大而明显的螢光斑点，R_f 值都很高。其中三块分別是橘紅色、蓝紫色和綠蓝色的，相当于 A_3、A_6 和 A_{10}。其位置則相当于谷螟 *Plodia interpunctella* 头部提取物在同样系統的层析中所表現出的 b、Isx（异黄蝶呤）和 C_1 这三块斑点（参看 Kühn 与 De Almeida, 1961）。另外两块皆是略呈蓝色的斑点。

这里就給出了五个系統紙层析的基本結果。看来这几个系統在分离和检定粘虫头部螢光物质方面是各有其一定意义的。另外一些溶剂系統的結果，因我們仍在継續研究中，这里未曾給出。

不同 pH 值的高压紙电泳能把粘虫复眼及头部提取物分离出十几块至二十块左右的斑点，图 4 和表 1 給出了 pH 8.4、4.5 和 1.9 这三种緩冲液的电泳結果，但一部分仅隐約可見或不够稳定的斑点未曾录出，此外，石油醚（电泳时的导热介质）多少还溶去一部分螢光物质。这方面的結果也表明大約有十块以上的主要螢光斑点。其中 pH 8.4 的 +11 可能相当于 pH 4.5 的 +7 和 pH 1.9 的 −10，这也相当于层析譜中的 A_6。而前者的 +18 相当于后二者的 +6 和 −7，是为层析譜中的 A_{10}。前者的 +9 相当于后二者的 +3 和 +1，它可

能是 A_{4}。

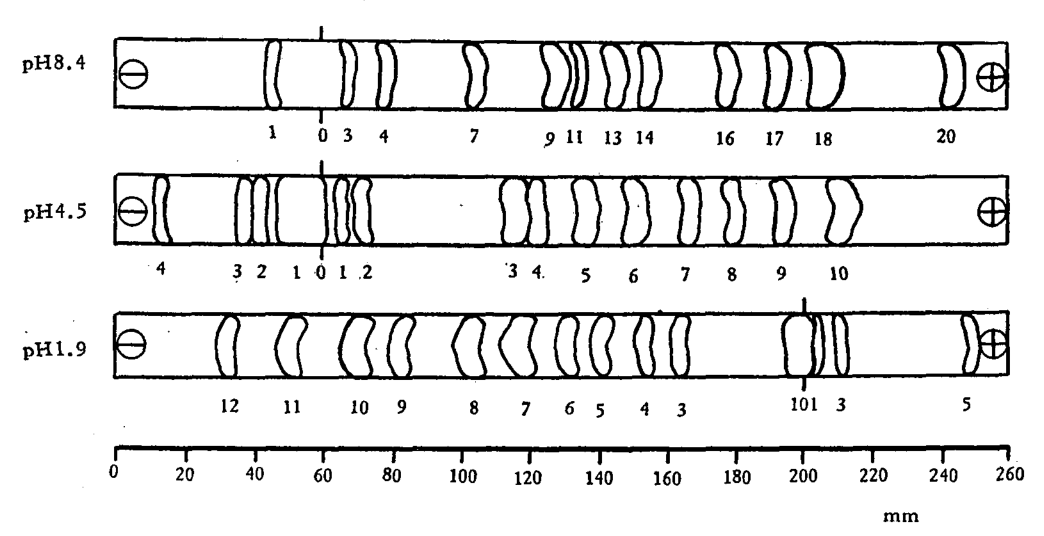


图 4　粘虫复眼提取物高压纸电泳所显示的螢光物质迁移图样

表 1　粘虫复眼提取物高压紙电泳的螢光物质检出結果

pH 値	电压梯度 (V/cm)	电流密度 (mA/cm)	电泳时间 (分)	槽内溫度 (℃)	斑点的颜色及亮度*											
8.4	50	4—5	80	18	⊕	3 V 黄	4 IV 黄	7 III 蓝	9 II 桔红	11 III 蓝紫	13 III 黄	14 III 蓝	16 III 蓝	17 IV 黄	18 I 亮綠	20 IV 蓝
					⊖	1 IV 蓝										
4.5	50	4.5—5.8	80	18	⊕	1 V 黄	2 V 黄	3 I 桔红	4 III 綠	5 V 蓝	6 I 亮綠	7 III 蓝紫	8 V 綠	9 V 蓝	10 V 黄	
					⊖	1 I 綠蓝	2 III 蓝	3 III 蓝	4 IV 黄							
1.9	50	1.8—2.0	60	14	⊕	1 II 桔红	3 III 黄	5 V 蓝								
					⊖	1 I 亮蓝	3 IV 黄	4 IV 綠	5 V 黄	6 IV 黄	7 I 亮綠	8 II 綠蓝	9 V 蓝	10 V 蓝紫	11 V 黄	12 V 蓝

* 亮度相对等级所用标准较前面层析谱的低。

最后我們仅就上述結果对粘虫头部螢光物质的存在状況簡单予以綜述和討論。通过这項工作我們查明了粘虫头部有二十种以上的螢光物質。并且几乎全部集中于复眼。两性之間沒有什么明显的差别。虽然这里沒有給出这些物質的吸收光譜研究結果，我們仍可以根据其螢光顏色、层析行为和电泳迁移等特性初步检定出六块斑点。A_6 是异黄蝶呤。A_8 是 2-胺基-6-羥基-蝶啶。A_9 是生物蝶呤。这三种蝶呤都是較普遍地存在于昆虫复眼中的。近几年来已經一再被研究者們所报导。当然 A_9 是否为生物蝶呤和异生物蝶呤的混合物，这是可疑的，尙待进一步査究（Tschesche 等，1962）。A_{10} 在許多溶剂系統的层析譜上都相当于粉螟与谷螟的 C_1 物質，我們可以說至少它是与 C_1 很相近似的化合物。C_1 已被检定为 Pterhorodin，它也是一种蝶呤（Kühn u. Egelhaaf 1959, Pfleiderer, 1963）。A_1 和 A_4 在上述研究結果以及异丙醇：2% 乙酸銨（1:1）和蒸餾水等溶剂系統中的层析行为都表現出相当于 Viscontini 与 Stielin（1962）所研究的粉螟中的 A 物質和 C 物質。这两者已被检定为 Lepidoptorin 和紅蝶呤（Erythropterin）。同时 A_4 的一些层析表現也接近 Pfleidorer（1962）对紅蝶呤所作的研究結果。此外，从螢光顏色和层析行为来推測，A_7 可以被認为是結构与黄蝶呤很接近的化合物。据此，我們能够說粘虫头部的主要螢光物質为蝶呤类的氮杂环化合物。至于地方种羣样本的比較分析方面，我們还沒有足够的証据作出确切的結論。但总的說来北方地区（东北、內蒙与华北）的样本是比較整齐一致的，而南方地区（华南与西南）的样本則有較多的問題，可能在某些地方种羣以及不同季节的样本間存在着有規律的差异，但这种差异的原因是属于遺传学方面还是生态学方面的尙不能断定。总之，我們这里仅报导了关于粘虫头部螢光物質的一些初步研究結果。还有許多問題有待深入研究。最主要的是这两方面的工作，一是对这些螢光物質作出进一步的分离，检定試驗，另一是对不同地方和季节的样本作仔細的比較分析。这些工作所获得的結果都可能对粘虫发生規律的研究有一定参考价値，因此我們認为，这方面的許多問題是应該进一步加以探究的。

参 考 文 献

Grossbach, U. 1957 Zur Papierchromatographischen Untersuchung von Lepidopteren-Augen. *Z. Naturforschg.* **12b**:462—5.

Kühn, A. & A. Egelhaaf 1959 Der rote Augenfarbstoff von Ephestia und Ptychopoda, ein Pterinpigment. *Z. Naturforschg.* **14b**:654—9.

Kühn, A. & F. F. De Almeida 1961 Fluoreszierende Stoffe und Ommochrome bei Genetypen von *Plodia interpunctella*. *Z. Vererbungslehre.* **92**:129—32.

Pfleiderer, W. 1962 Pteridine, XXIV. Über die Isolierung und Struktur des orangeroten Schmetterlingspigmentes "Erythropterin". *Chem. Ber.* **95**:2195—204.

Pfleiderer, W. 1963 Pterorhodin, ein neue naturliches Schmetterlingspigment. *Z. Naturforschg.* **18b**:420.

Tschesche, R., B. Hess, I. Ziegler & H. Machleida 1962 Über Pteridine, XVII. Trennung von synthetischem Biopterin und Isobiopterin. *Liebigs Ann. Chem.* **658**:194—201.

Viscontini, M. & H. Stielin 1962 Fluoreszierende Stoffe aus Ephestia kuhniella Zeller. 3. Mitteilung. Helv. *Chim. Acta,* **45**:2479—3487.